

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **58180487 A**(43) Date of publication of application: **21.10.83**

(51) Int. Cl

C07D487/04
C12P 17/18
// A61K 31/55
A61K 31/55
A61K 31/55
A61K 31/55
A61K 31/55
(C12P 17/18 , C12R 1/465)

(21) Application number: **57063630**(22) Date of filing: **16.04.82**(71) Applicant: **KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD**

(72) Inventor:
TOMITA FUSAO
KAWAMOTO ISAO
TAMAOKI TATSUYA
ASANO KOZO
MORIMOTO MAKOTO
IMAI RYOJI
FUJIMOTO KAZUHISA

(54) **ANTIBIOTIC DC-81 AND ITS PREPARATION**

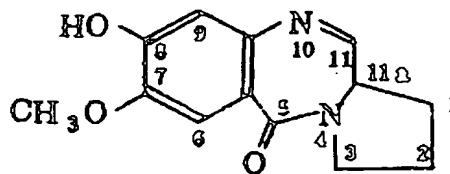
(57) Abstract:

NEW MATERIAL: An antibiotic DC-81 shown by the formula.

USE: An antibacterial agent, and disinfectant. Having antibacterial activity and antitumor activity.

PROCESS: A bacterium such as DC-81 strain (FERM-P 6502) belonging to the genus *Streptomyces*, capable of producing DC-81, is cultivated in a medium, DC-81 is accumulated in the culture, and DC-81 shown by the formula is collected from the culture. Properly, the culture temperature is 25W40°C, and the pH of the medium is 4W10. Having the following physical and chemical properties. Melting point: 98W105°C, molecular weight: 246 (mass spectrum method), molecular formula: $C_{13}H_{14}O_3N_2$; specific rotatory power; $[\alpha]^{22}_D = +135^\circ$ (c 0.2, methanol); solubility: easily soluble in DMSO, methanol, etc., soluble in ethyl acetate, and water, slightly soluble in ethyl ether, and n-hexane.

COPYRIGHT: (C)1983,JPO&Japio



⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—180487

⑭ Int. Cl.³
C 07 D 487/04
C 12 P 17/18
// A 61 K 31/55
識別記号
1 2 8
A A E
A A H
A A Y
A D U
A D Z
庁内整理番号
8115—4C
7258—4B
6675—4C
6675—4C
6675—4C
6675—4C
6675—4C
—
6760—4B
(C 12 P 17/18
C 12 R 1/465)

⑬ 公開 昭和58年(1983)10月21日

発明の数 2
審査請求 未請求

(全 9 頁)

⑭ 抗生物質 D C—81 およびその製造法

⑮ 発明者 玉沖達也

町田市中町 3—9—9

⑯ 特 願 昭57—63630

⑯ 出 願 人 協和醗酵工業株式会社

⑰ 出 願 昭57(1982)4月16日

東京都千代田区大手町 1 丁目 6
番 1 号

⑱ 発明者 富田房男
町田市本町田 1420—18

⑲ 代理人 弁理士 野波俊次

⑳ 発明者 川本勲
平塚市ふじみ野 1—21—2

最終頁に続く

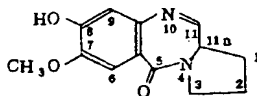
明 細 書

1. 発明の名称

抗生物質 D C—81 およびその製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) 次の平面構造式によつて特定される新規化合物 D C—81。



- (2) ストレプトマイセス属に属し、D C—81を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、D C—81を培養物中に蓄積させ、培養物から D C—81を採取することを特徴とする特許請求の範囲第 1 項記載の化合物 D C—81の製造法。

- (3) 微生物がストレプトマイセス・ロゼイスクレロテिकास D C—81 (微工研菌寄第 6502 号) である特許請求の範囲第 2 項記載の製造法。

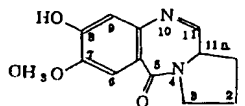
3. 発明の詳細な説明

本発明は新規抗生物質およびその製造法に関し、とくに本発明者によつて D C—81 と命名された新規抗生物質およびその製造法に関する。

本発明は、ストレプトマイセス属に属するある種の微生物が、新規抗生物質 D C—81を生産するという知見に基いている。

本発明の目的は新規で有用な物質を提供することにある。

本発明による新規物質 D C—81は、次の平面構造式によつて特定される新規化合物であることを特徴としている。



D C—81は後述のように、ある種の菌に抗菌活性を示すので、それらの菌を原因菌とする感染症に対して治療効果を有するものと期待される。また D C—81は抗腫瘍作用を示すこと

を認めた。

本物質はいわゆる 1, 4-ベンゾジアゼピン誘導体に属し、鎮痛、鎮静、鎮痙剤としての用途の可能性もある。

本発明による D O - 8 1 物質の理化学的性質および生物学的性質は次の通りである。

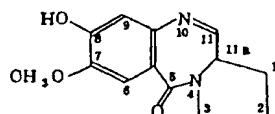
1. 理化学的性質

- (1) 融点: 98 ~ 105 °C
- (2) 分子量: 246 (マススペクトル法)
- (3) 分子式: $C_{11}H_{14}O_3N_2$
- (4) 紫外吸収スペクトル (メタノール中):
224, 236, 280 (sh), 316 (nm)
- (5) 赤外吸収スペクトル (KBr錠剤法):
第 1 図に示す。
- (6) PMR スペクトル (重水素置換クロロホルム中, TMS 基準) (ppm):
1.8 ~ 2.33 (4H), 3.3 ~ 3.8 (3H), 3.84 (3H), 6.89 (1H), 7.48 (1H), 7.63 (1H)

(3)

第 1 表

展 開 剤	Rf
クロロホルム・アセトン (33:67 v/v)	0.38
クロロホルム・メタノール (9:1 v/v)	0.29
0.05N NH_4OH 飽和酢酸エチル	0.12
トルエン・エタノール・アンモニア水 (40:10:0.1 v/v)	0.27
(1)~(9)	
上記の理化学的性質から本発明化合物は次の平面構造式を有すると決定された。	



II. 生物学的性質

(1) 抗菌活性

抗菌活性 (懸天稀釈法、pH 7.0) を第 2 表に示す。

次表の通り、D O - 8 1 物質は抗菌活性を有し、抗菌剤あるいは消毒剤としての用途が期待できる。

(5)

(7) OMR スペクトル (重水素置換クロロホルム中、TMS 基準):

24.2, 29.5, 46.7, 53.7, 56.0, 111.4, 113.1, 119.4, 140.8, 146.2, 149.2, 162.5, 164.9

(8) 比旋光度: $[\alpha]_D^{22} = +13.5^\circ$ (0.2, メタノール)

(9) 溶解性: ジメチルスルホキシド, メタノール, クロロホルム, アセトンによくとける。酢酸エチル、水に可溶、エチルエーテル, n-ヘキサンにはほとんどとけない。

(10) Rf 値: 薄層クロマトグラフィー [シリカゲル (商品名 Kieselgel 60 Art. 5721, E. Merck, 西独) を用い、室温で 3 時間展開] での Rf 値は第 1 表の通りである。

(4)

第 2 表

試 験 菌 名	MIO ($\mu g/ml$)
スタフィロコッカス・アウレウス ATC 06538 P	50
バチルス・ズブチリス 株 10707	50
エシエリキア・コリ ATC 026	200
サルモネラ・タイホサ ATC 09992	50
シゲラ・ゾネイ ATC 09290	50

(2) 急性毒性

急性毒性 (LD_{50}) は、マウスへの腹腔内投与の場合 42 mg/Kg である。

(3) 抗腫瘍活性

リンホサイテック・リュケミア P-388 腫瘍に対する効果
体重約 22g の ODF₁ 雄マウス 1 群 5 匹に、リンホサイテック・リュケミア (Lymphocytic leukemia) P-388

(6)

腫瘍細胞 1×10^6 個を腹腔内移植した。移植後 24 時間目に D O - 81 物質の生理食塩水溶液 0.2 ml を 1 回腹腔内に投与した。比較例として、腫瘍細胞移植後 24 時間目にマイトマイシン O の生理食塩水溶液 0.2 ml を腹腔内投与した群を設けた。移植後の平均生存日数および T / O (T : 試験例の平均生存日数、O : 対照の平均生存日数) を第 3 表に示す。

第 3 表

被 験 物 質	投 与 量 (mg/Kg)	生存日数	延命効果 (T/O)
D O - 81	20	10.6	1.20
	10	11.2	1.24
	5	10.1	1.12
マイトマイシン O	4	12.6	1.40
対 照	—	9.0	—

(7)

色素は pH インディケーターではない。気中菌糸の着生は、スターチ・寒天培地では良好であるが、全般的には普通の着生を示し、その色調は白色ないし灰色である。胞子は、伸長した気中菌糸から単純分枝した胞子柄に 10 個以上のらせん状連鎖 (spirals) として着生する。胞子の形態は楕円ないし卵形で大きさは $1.0 \sim 1.1 \mu \times 0.4 \sim 0.6 \mu$ であり、電子顕微鏡観察による胞子表面は平滑 (smooth) ないし粗面 (warty) で鞭毛は認められない。また胞子のうも見い出されない。

II. 各種培地上での生育状態

各種培地上で 28°C で 2 週間培養したときの生育および色の特徴を下記に示す。色の表示は Color Harmony Manual (Container Corporation of America) による色の分類による。可溶性色素は、使用した培地のいずれにも検出されない。

(1) シュクロース・硝酸塩寒天培地

生育： 良好，平坦

(9)

本発明による抗生物質 D O - 81 の製造法は、ストレプトマイセス属に属し、D O - 81 を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、D O - 81 を培養物中に蓄積させ、この培養物から D O - 81 を採取することによつて得ることを特徴としている。

本発明において使用する微生物はストレプトマイセス属に属し、D O - 81 を生産する能力を有する微生物であればいずれの微生物も用いることができるが、好適な菌の例は本発明者が静岡県三島市内の土壌から分離した菌株 D O - 81 株 (微工研菌寄第 6502 号) である。本菌株の菌学的性質は次の通りである。

1. 形態的性質

本菌株は、種々の天然および合成培地で良好もしくは普通の生育を示し、その基生菌糸の色は一般に薄黄色ないし茶色であるが、とくにグリセロール・アスパラギン寒天培地、卵・アルブミン寒天培地もしくはブドウ糖・酵母エキース寒天培地では赤色を帯びる。この

(8)

基生菌糸の表面、裏面の色：フレッシュ・ピンク (4ca) ないしフレッシュ・ピンク (5ca)

気中菌糸：普通，白色 (a)

(2) グルコース・アスパラギン寒天培地

生育： 貧弱，隆起状

基生菌糸の表面、裏面の色：ライト・アイボリー (2ca) ないしフレッシュ・ピンク (5ca)

気中菌糸：なし

(3) グリセロール・アスパラギン寒天培地

生育： 普通，平坦

基生菌糸の表面、裏面の色：チエスナッツ・ブラウン (4n1)

気中菌糸：貧弱，白色 (a)

(4) スターチ・無機塩寒天培地

生育： 良好，隆起状

基生菌糸の表面、裏面の色：マーブル (41e) ないしライト・ブラウン (4ng)

気中菌糸：豊富，白色 (a) ないしフレッシュ

(10)

シユ・ピンク(4ca)

(5) 卵・アルブミン寒天培地

生育： 貧弱，平坦

基生菌糸の表面、裏面の色：ダーク・ラツカ
ー・レッド(6pe)

気中菌糸：貧弱，白色(a)

(6) 栄養寒天培地

生育： 普通，平坦

基生菌糸の表面、裏面の色：ライト・イエ
ロー(1½ca)

気中菌糸：普通，ピンク・チント(7ba)

(7) 酵母エキス・麦芽エキス寒天培地

生育： 普通，隆起状

基生菌糸の表面、裏面の色：ライト・ウイ
ート(2sa)

気中菌糸：普通，パール・シエル・チント
(3ba)

(8) オートミール寒天培地

生育： 良好，隆起状

基生菌糸の表面、裏面の色：バンブー(2gc)

(11)

生育： 良好，隆起状

基生菌糸の表面、裏面の色：ライト・アイ
ボリー(2ca)

気中菌糸：普通，パール・シエル・チント
(3ba)

(13) ペプトン・酵母エキス・鉄寒天培地

生育： 普通，隆起状

基生菌糸の表面、裏面の色：パール・ピン
ク(3ca)

気中菌糸：普通，白色(a)

(14) チロシン寒天培地

生育： 普通，隆起状

基生菌糸の表面、裏面の色：フレッシュ・
ピンク(5ca)ないしバーガン
デイ(7pe)

気中菌糸：普通，フレッシュ・ピンク(4ca)

(15) グリセロール・リンゴ酸カルシウム寒天
培地

生育： 普通，平坦

基生菌糸の表面、裏面の色：オールド・ワ

(13)

気中菌糸：普通，白色(a)ないしアイボ
リー・チント(2cb)

(9) グルコース・酵母エキス寒天培地

生育： 良好，粒状

基生菌糸の表面、裏面の色：ライト・アイ
ボリー(2ca)ないしデイブ・
レッド・ブラウン(6½pe)

気中菌糸：普通，白色(a)ないし灰色
(5fo)

(10) ベネット氏寒天培地

生育： 普通，隆起状

基生菌糸の表面、裏面の色：バンブー(2go)

気中菌糸：普通，サンド(3ob)

(11) エマーソン氏寒天培地

生育： 普通，粒状

基生菌糸の表面、裏面の色：パール・ピン
ク(2gc)

気中菌糸：普通，オーキッド・チント(10
ba)

(12) ヒツキ・トレスナー氏寒天培地

(12)

イン(7½ng)

気中菌糸：貧弱，白色(a)

III. 生理的性質

(1) 炭素源の発化性(ブリドハム・ゴドリー
ブ寒天培地上)：D-グルコース、L-ア
ラビノース、D-キシロース、L-イノシ
トール、D-マンニトール、D-フラクト
ース、L-ラムノース、シユクロース、D-
ラフィノースを発化する。

(2) グラチンの液化作用： なし。

(3) ミルクに対する作用： 凝固も液化も
しない。

(4) スターチの加水分解作用： あり。

(5) 生育温度範囲： 20~40℃

(6) メラニン様色素の生成： なし。

ただし、(2)グラチンの液化作用は20℃で
3週間後、(3)ミルクに対する作用については
28℃で3週間後、(5)生育温度範囲は5日後、
その他については28℃で2週間後の観察結
果である。

(14)

IV. 細胞壁組成

細胞壁構成アミノ酸の一つであるジアミノピメリン酸を分析した結果、LL-2,6-ジアミノピメリン酸が検出された。

上記の菌学的性質において、気中菌糸を形成し、単純分枝をなし、その先端に長い孢子鎖を形成し、さらに細胞壁にLL-ジアミノピメリン酸を含むことから、本菌株は放線菌目の中でストレプトマイセス属に分類される。

V. 種の同定

本菌株は孢子鎖がらせん状をなし、スパイラル(spiral)セクションに属し、孢子表面は平滑(smooth)もしくは粗面(warty)である。各種寒天培地上での気中菌糸の色は、おおむね白色で、薄黄もしくはピンクを帯びた灰色の場合もある。しかし、グリーンヤブルー系の色は示さない。基生菌糸の色は、クリームからオレンジもしくはブラウン系の色で、とくにグリセロール・リンゴ酸カルシウム寒天培地および卵・アルブミン寒天培地で

(15)

イエス・オカーセイスクレオテイカス(*S. ochraceiscleroticus*)、ストレプトマイセス・フロカルス(*S. flocculus*)およびストレプトマイセス・ピナセウス・ドラプス(*S. pinaceus-drappus*)。

これらの菌株のうち、ストレプトマイセス・ロゼイスクレオテイカスおよびストレプトマイセス・スクレロテニアラス、ストレプトマイセス・オカーセイスクレオテイカスはいずれも菌核を形成するタイプの菌種であるが、本菌株では菌核の形成は見られない。しかし、菌核を形成する菌種においても、気中菌糸を比較的良好に増殖する場合は菌核が見られないことが知られている。従って、気中菌糸が豊富に形成される本菌株の同定にあつては、菌核の有無を考慮から除外した。

これら6株を文献上でさらに詳細に本菌株と比較したところ、気中菌糸と基生菌糸の色調において相違が見られた。

気中菌糸については、ストレプトマイセス・

(17)

は赤色を示すのが特徴的である。いずれの場合も色素はpHインディケーターではない。また、可溶性色素およびメラニン様色素の産生は見られない。炭素源として、L-アラビノース、D-キシロース、L-イノシトール、D-マンニトール、L-ラムノース、D-ラフィノースなど広い糖変換能を有する。

本菌株の類似株を、細菌学名承認リスト(Int. J. System. Bacteriol. 30巻, 225頁, 1980年)において承認されている既知菌株の中から探索した結果、Int. J. System. Bacteriol. 18巻, 89頁, 279頁, 1968年、19巻, 391頁, 1969年、22巻, 265頁, 1972年から、次の8菌株が近縁種として挙げられる。ストレプトマイセス・ロゼイスクレオテイカス(*Streptomyces roseiscleroticus*)、ストレプトマイセス・スクレロテニアラス(*S. sclerotialis*)、ストレプトマイセス・リバーニ(*S. libani*)、ストレプトマ

(16)

ロゼイスクレオテイカスとストレプトマイセス・スクレロテニアラスの両株は本株と類似しているが、他の4株では、本株と比較してブラウンの色調が濃調であつた。

基生菌糸においては、6株ともイエローもしくはブラウン系の色を示すが、本株の特徴とみなせるレッド系の色を含むものは、ストレプトマイセス・ロゼイスクレオテイカスのみであつた。

従つて、オートミール寒天培地での基生菌糸の色調が濃い点を除けば、ストレプトマイセス・ロゼイスクレオテイカスが本菌株と比較的良好に一致していると判断した。

よつて本菌株をストレプトマイセス・ロゼイスクレオテイカスDO-81(*Streptomyces roseiscleroticus* DO-81)と命名し、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第6502号として寄託した。

(18)

次に培養法について述べる。本発明の培養法は通常の放線菌の培養と同様である。すなわち、培地の炭素源としては、たとえばブドウ糖、澱粉、デキストリン、マンノース、フラクトース、シクロロース、ラクトース、糖蜜が単独または組み合わせて用いられる。さらに、菌の資化能によつては炭化水素、アルコール類、有機酸なども用いられる。窒素源としては、塩化アンモン、硫酸アンモン、硝酸アンモン、硝酸ソーダ、尿素などの窒素含有化合物、およびペプトン、肉エキスを、酵母エキスを、乾燥酵母、コーン・ステープ・リカー、大豆粉、カザミノ酸などの窒素含有天然物が単独または組み合わせて用いられる。必要に応じて、食塩、塩化カリ、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、磷酸二水素カリウム、磷酸水素二カリウム、硫酸第一鉄、塩化カルシウム、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸銅などの無機塩類を加えてもよい。さらに使用菌の生育やD O - 8 1の生産を促進する微量成分たとえばビタミンB₁、ビオチンなどを適当に

(19)

溶媒で抽出する。抽出液を濃縮乾固し、アンモニア水飽和酢酸エチルに溶解する。この溶液を予め同じ溶媒で懸濁後、カラムに充填したシリカゲルを用いてクロマトグラフィーを行なう。アンモニア水飽和酢酸エチルで溶出し、活性成分を濃縮乾固し、少量のメタノールに溶解する。このメタノール溶液を、予めメタノールに懸濁した後カラムに充填したセファデックスLH-20 (Pharmacia Fine Chemicals Inc., Sweden)のカラムに通塔し、D O - 8 1の成分を得る。これを酢酸エチルまたはクロロホルム・エチルエーテル・石油エーテルの混合溶媒から結晶化させてD O - 8 1を得ることができる。

実施例1

細菌としてストレプトマイセス・ロゼイスクレロテイクスD O - 8 1を用いた。

菌株を2ℓ容量の三角フラスコ中に植培地(デキストリン20g/ℓ, グルコース10g/ℓ, ペプトン10g/ℓ, コーン・ステープ・リカー5g/ℓ, 酵母エキスを1g/ℓ, KH₂PO₄

(21)

添加することができる。

培養法としては、液体培養法、とくに深部攪拌培養法が適している。培養温度は25~40℃、とくに28~38℃^{が適当である}とする。培地のpHは4~10、とくに6~8が適当で、アンモニア水や炭酸アンモン溶液などでpHを調節する。液体培養の場合、通常1日ないし7日の培養で、著量の目的物質D O - 8 1が培養液中に生成蓄積される。培養物中の蓄積量が最大に達したときに培養を停止し、菌体を分別する。

培養液からのD O - 8 1物質の単離精製には、微生物代謝生産物を、その培養液から単離するために用いられる通常の分離・精製法を利用することができる。たとえば、培養液(たとえばpH 6.0)を活性炭(和光純薬)に通塔して活性成分を吸着させた後、メタノール・ビリジン・アンモニア・水(86:3:1:10 v/v)などを用いて活性炭から吸着された物質を溶出する。溶出液を濃縮乾固し、pH 7.0の適当な緩衝液に溶解し、n-ブタノールなどの

(20)

0.5g/ℓ, MgSO₄・7H₂O 0.5g/ℓ, CaCO₃ 1g/ℓ (pH 7.2)] 300mlに植菌し、30℃で48時間振とう(220 r. p. m.)培養した。得られた培養液を30ℓ容量のジャーファーマンター中の下記組成の発酵培地15ℓに5% (容量)の割合で移し、30℃で通気攪拌方式(回転数250 r. p. m.、通気量15ℓ/min)により培養を行なつた。

発酵培地組成: デキストリン50g/ℓ, 大豆粕20g/ℓ, KH₂PO₄ 0.5g/ℓ, MgSO₄・7H₂O 0.5g/ℓ, CaCO₃ 5g/ℓ, pH 7.2 (殺菌前)にNaOHで調整する。

培養中、培地のpHは制御しないで、72時間培養した。培養液より菌体および沈殿物を分別し、^を上清液13ℓを得た。上清液1ℓの活性炭(和光純薬)に通塔して活性物質を吸着させ、水約3ℓで水洗後、メタノールでさらに洗浄して不純物を除去する。次にメタノール・ビリジン・アンモニア・水(86:3:1:10 v/v)5ℓを用いて吸着された物質を活性炭から溶出

(22)

する。この溶出液を濃縮乾固した後、少量の0.05N NH_4OH 飽和酢酸エチルに溶解する。この溶液を、予め同じ溶媒で懸濁したのちカラムに充填したシリカゲル（メルク社製）を用いてクロマトグラフィーを行なう。活性画分を同じ方法で再びクロマトグラフィーし、濃縮後、少量のトルエン・エタノール・ NH_4OH （45：5：0.1 v/v）に溶解し、予め同じ溶媒で懸濁したカラムに充填したシリカゲルを用いてクロマトグラフィーを行なつた。活性画分を集めて濃縮後、酢酸エチルを加えてD O - 81の粉末を得た。この粉末を減圧下40℃で乾燥してD O - 81の純品約200mgを得ることができた。

このようにして得られたD O - 81の理化学的性質、抗菌活性、抗腫瘍活性は前記の通りであつた。

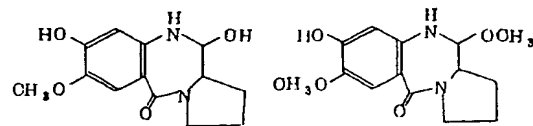
なお、本物質は、いわゆる（1，4）ベンゾジアゼピン系化合物に属し、この系統の化合物について広く認められているようにO - 11位に水またはアルコール（メタノールなど）が付

(23)

4. 図面の簡単な説明

第1図はD O - 81の赤外部吸収スペクトルを示す。

加したものが容易に得られる。これらの構造は下記のように示すことができる。



しかし、これらの物質は前記のように減圧下に乾燥することによつて容易にD O - 81に変わる。

実施例2

実施例1において、発酵培地組成を次のものに代えて行なう以外は実施例1と同様に行ない、D O - 81約120mgを得た。

発酵培地組成：可溶性澱粉40g/ℓ，大豆粕粉末30g/ℓ，コーン・ステープ・リカー5g/ℓ， K_2HPO_4 0.5g/ℓ， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/ℓ， KOH 0.3g/ℓ， CaCO_3 3.0g/ℓ，pH 7.2（殺菌前）に NaOH で調整した。

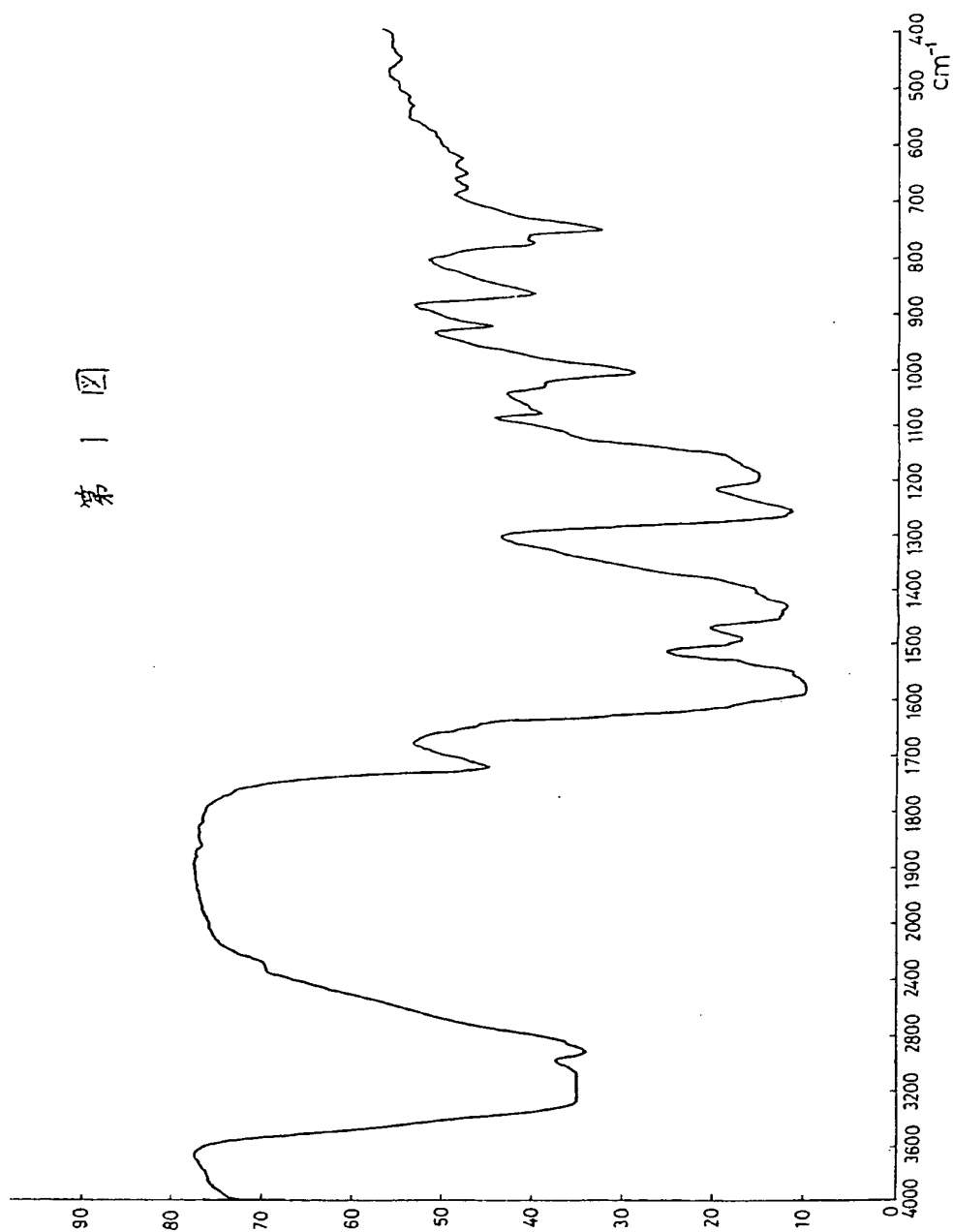
(24)

特許出願人 協和醸酵工業株式会社
代理人 弁理士 野波俊次



(25)

第 1 図



第1頁の続き

- ⑦発明者 浅野行蔵
町田市中町3-9-10
- ⑦発明者 森本眞
沼津市御幸町13-9
- ⑦発明者 今井良二
三島市徳倉1014-9
- ⑦発明者 藤本和久
静岡県駿東郡長泉町下土狩1188